

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**Klinickobiochemické markery infarktu myokardu**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.

Hradec Králové 2012

Jana Ulrychová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Prof. RNDr. Miloši Tichému, CSc. Za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi věnoval a přispěl tak k vypracování této bakalářské práce. Dále pak Prof. MUDr. Jaroslavovi Dršatovi, CSc. Jakožto mému garantovi za farmaceutickou fakultu.

## **PROHLÁŠENÍ**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 1. 3. 2012

Podpis:

# Obsah

1. Úvod .....	6
2. Teoretická část .....	8
2.1. Historie .....	8
2.2. Klinickobiochemické markery akutního infarktu myokardu .....	11
2.2.1. Cytoplazmatické bílkoviny .....	11
2.2.1.1. Kreatinkináza (CK) .....	11
2.2.1.2. Myoglobin (MG) .....	13
2.2.1.3. Laktátdehydrogenáza (LD) .....	14
2.2.2. Mitochondriální bílkoviny .....	15
2.2.2.1. Aspartátamonitransferáza (AST) .....	15
2.2.3. Strukturální bílkoviny .....	15
2.2.3.1. Troponiny .....	15
2.2.3.1.1. Troponin T (TnT) .....	16
2.2.3.1.2. Troponin I (TnI) .....	17
2.2.3.1.3. Troponin C (TnC) .....	17
2.3. Některé novější markery srdečního selhání .....	20
2.3.1. Ischémií modifikovaný albumin (IMA) .....	20
2.3.2. Natriuretické peptidy (NP) .....	21
2.3.3. Vysoce senzitivní troponin T (hs-TnT) .....	23
2.3.4. Mastné kyseliny vážící protein (FABP) .....	23
2.3.5. C-reaktivní protein (CRP) .....	24
2.3.6. Solubilní CD40 ligand (sCD40 L) .....	25
2.3.7. Placentární růstový faktor (PIGF) .....	25
2.3.8. Glykogenfosforyláza BB (GPBB) .....	26
2.4. Doba odezvy pro stanovení srdečních biomarkerů (Turn And Time, TAT) ..	27
3. Cíl práce .....	28
4. Praktická část .....	29
4.1. Point of care testing (POCT) .....	29
4.2. Imunochemické metody .....	30
4.2.1. Imunochemická metoda na principu chemiluminiscence .....	30

4.3. Stanovení kardiálních markerů technologií proteinových biočipů- multimarkerová strategie .....	32
5. Závěr .....	34
6. Seznam zkratek .....	35
7. Literatura .....	37

# 1. Úvod

Klinická biochemie má důležitou roli nejen v průkazu a monitorování rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění, ale i v diagnostice infarktu myokardu.

Současně nabízí velmi pestrou paletu biomarkerů poškození myokardu, které mají vztah k průběhu patologických dějů – od zánětlivých změn cévní stěny, přes markery destabilizace koronárního plátu, markery ruptury sklerotického plátu až po markery ischemie a nekrózy.

Tyto biomarkery byly částí studie MORGAM Biomarker Project a reprezentovaly 9 rozdílných metabolických procesů ve spojení s aterosklerózou:

- a) lipidové biomarkery,
- b) markery funkce ledvin,
- c) metabolické markery reprezentované glukózou a obezitou,
- d) markery funkce cév a neurohumorální aktivity,
- e) markery zánětu,
- f) markery oxidačního stresu a antioxidanty,
- g) koagulační markery,
- h) markery angiogeneze,
- i) markery nekrózy.

Infarkt myokardu (IM) je diagnostikován podle přítomnosti nejméně dvou z triády typických příznaků: více než půl hodiny trvající bolest na hrudi, změny na elektrokardiogramu a biochemické laboratorní ukazatelé.

V krevním séru (plazmě) pacienta prokazujeme intracelulární bílkoviny, které se uvolňují z ischemického ložiska v myokardu do krve. Jsou to markery myokardiální ischemie a nekrózy myokardu.

V klinické praxi v průběhu téměř 50 let mezi běžně užívané laboratorní ukazatelé patřily markery aspartátaminotransferáza (AST), laktátdehydrogenáza (LD), kreatinkináza (CK), včetně izoformy MB-frakce (CK-MB) a myoglobin (MG).

Nejcitlivějším a nejspecifičtějším biomarkrem pro nekrózu myokardu se v posledních letech po roce 1995 staly srdeční troponiny T (TnT) nebo I (TnI).

S prodlužováním průměrné délky života a s nástupem nových velmi účinných terapeutických postupů, stoupá i počet jedinců s různým stupněm srdečního selhávání. V posledních letech se intenzivně hledá nový marker myokardiální ischemie. Jedním z takových ukazatelů, do kterých se vkládají velké naděje, je stanovení vazebné kapacity albuminu na kobalt (ACB), dále je to rozpustný CD40 ligand, cholin, mastné kyseliny vázící protein (FABP), vysoce senzitivní troponin hs-T nebo I a další. Pro diagnostiku srdečního selhání se jeví být vhodnými markery natriuretické peptidy (NP), pro klinickou praxi především peptidy BNP a NT-proBNP.

Kromě již běžně užívané elektrokardiografické metody (EKG) novým kritériem pro diagnózu infarktu myokardu je průkaz ztráty viabilního myokardu pomocí zobrazovacích metod, v nichž dominantní roli hrají vyšetření echokardiografická, radioizotopová a kardiovaskulární magnetická rezonance.

Ke stanovení kardiálních markerů se užívá různých imunochemických metod (imunoturbidimetrie, imunonefelometrie, enzymové imunoanalýzy, rychlé imunochemické testy).

V současnosti přibývá také multimarkerových studií. Především se kombinuje současné stanovení troponinu, hsCRP a NT-proBNP. Tyto tři biomarkery odrážejí rozdílné patofyziologické mechanismy srdeční ischemie: nekrózu, zánět a přetížení levé komory. Můžeme předpokládat, že takto obdržíme komplexnější informaci o stavu nemocného, která umožní individualizovat terapii.

## 2. Teoretická část

### 2.1. HISTORIE

V průběhu padesátých let minulého století se snažili kliničtí biochemici a kardiologové získat spolehlivou a rychlou laboratorní metodu k průkazu nekrózy srdečního svalu (Friedecký a kol. 2010).

V roce 1954 Karmen a spol. byla poprvé prokázána zvýšená aktivita aspartátaminotransferázy (AST) v séru nemocných akutním infarktem myokardu (AIM) pocházející z poškozených kardiomyocytů, což byl počátek enzymologie AIM. Následovalo stanovení aktivity dalších enzymů, v roce 1956 byla popsána zvýšená aktivita dehydrogenázy kyseliny mléčné (LDH) a v roce 1960 kreatinkinázy (CK) v séru nemocných AIM. Další vývoj směřoval ke zvýšení specifity kardiálních markerů.

V sedmdesátých letech začal být využíván v diagnostice AIM index izoenzymů LD1/LD2 a do klinické praxe bylo zavedeno stanovení aktivity izoenzymu CK-MB (Tichý M.). Stanovení kreatinkinázy (CK) a izoenzymu CK-MB se pak stalo po téměř 25 let „zlatým standardem“ při biochemické diagnostice akutního infarktu myokardu (Friedecký a kol. 2010).

V posledních asi 15 letech probíhá rozšiřování spektra biochemických markerů kardiálního poškození velmi dynamicky a kontinuálně. Došlo k inovaci metody na stanovení myoglobinu, stanovení koncentrace CK-MB mass, ke zvýšení citlivosti stanovení CRP (hsCRP) a k zavedení stanovení natriuretických peptidů (BNP a NT-proBNP) do klinické praxe.

Testovány a používány jsou další biomarkery, které mají vztah k průběhu patologických dějů poškození myokardu (GPBB, IMA, CD40 ligand, metaloproteinázy, myeloperoxidázy apod), (Friedecký a kol. 2010).

Naprostou suverénními kardiálními markery v diagnostice srdečního poškození je v současnosti zavedení průkazu srdečních troponinů T a I do klinické praxe.



Objevitel troponinu T (cTnT) Hugo A. Katus učinil tento objev jako vedlejší produkt jiného výzkumu. V roce 1982, když Katus analyzoval specifičnost kozího polyklonálního antiséra proti lidským lehkým řetězcům myosinu, detekoval náhodně také frakci kardiospecifických protilátek proti troponinu T, který byl přítomen jako kontaminace antigenu – tedy lehkých řetězců myosinu. Toto pozorování vedlo k izolaci a purifikaci cTnT. Od pozorování v roce 1982 uběhlo 11 let nepřetržité práce, než se tento parametr stal v klinice definitivně jedním ze srdečních biomarkerů. Klíčem k úspěchu troponinu T a současně i troponinu I byla a je především jejich téměř absolutní kardiospecifita.

V dnešní době začínáme pracovat se soupravami troponin T high sensitive (cTnT hs), což jsou soupravy již páté generace (Friedecký a kol. 2010).

V roce 1999 byla publikována dvě doporučení pro diagnostiku akutních koronárních syndromů (AKS) a standardizaci podmínek pro stanovení kardiomarkerů. Jde o doporučení Národní akademie klinické biochemie USA (NACB) a z jeho textu odvozené lehce modifikované doporučení Mezinárodní federace klinické biochemie a laboratorní medicíny (IFCC), (Tichý a kol. 2004).

V roce 2000 pak bylo zveřejněno společné doporučení evropských (European Society of Cardiology, ESC) a amerických (American College of Cardiology, ACC) kardiologů formou konsenzuálního dokumentu pojednávající o redefinici AIM. Dokumenty doporučují použití dvou biochemických markerů pro rutinní diagnostiku AIM, a to markeru časného (myoglobin) do 6 hodin po počátku symptomů a markeru definitivního za 6-9 hodin a dále za 12-24 hodin, který je citlivý a kardiospecifický (troponiny) a zůstává pozitivní po řadu dní (Tichý a kol. 2004).

V roce 2006 Dolci a Panteghini publikovali charakteristiku ideálního srdečního biomarkeru: vysoká citlivost (vysoká koncentrace v myokardu po jeho poškození, rychlé uvolnění pro časnou diagnostiku, dlouhý poločas v krvi pro pozdní diagnostiku), vysoká specifita (chybění v jiné tkáni než myokardu, nepřítomnost v krvi u zdravých subjektů), analytické charakteristiky (měření „cost-effective“ kity, jednoduché provedení, rychlý TAT, dostatečná přesnost a věrohodnost), klinické charakteristiky (schopnost ovlivnění terapie, schopnost zlepšit vyhlídky nemocného), (Tichý a kol. 2010).

Za mezník lze považovat konec roku 2007, kdy byla publikována dlouho očekávaná univerzální definice infarktu myokardu, jako společný konsenzus odborníků Evropské kardiologické společnosti, American Heart Association a dalších. Jde o dokument vymezující kritéria pro diagnostiku AIM. Tato kritéria přinášejí jasný pohled na využití laboratorních ukazatelů nekrózy myokardu, kdy je preferenčně doporučeno stanovení srdečních troponinů (cTn) před stanovením kreatinkinázy, resp. její MB frakce (CK-MB). Stanovení AST, laktátdehydrogenázy, iso-LD a ostatních markerů se již nedoporučuje. Podobně i doporučení České společnosti klinické biochemie České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně vydána v roce 2007 potvrzují vedoucí místo stanovení srdečních troponinů pro důkaz myokardiální nekrózy (Pudil a kol. 2008).

## 2.2. KLINICKOBIOCHEMICKÉ MARKERY AIM

Biochemicky důležité složky kardiomyocytu se nacházejí v cytoplazmě nebo mitochondriích a další jsou součástí kontraktálního aparátu. Při infarktu myokardu se uvolňují do cirkulace. Při krátkodobé ischemii se v důsledku funkčních a později i strukturálních změn buněčných membrán do krevní cirkulace vyplavují cytoplazmatické bílkoviny. Při dlouhodobější ischemii se vyvíjí nekróza tkáně a do krevního oběhu se uvolňují i strukturální bílkoviny. Cytosolové proteiny se tedy uvolňují rychleji než strukturální bílkoviny (<http://www.wikiskripta.eu/>).

### 2.2.1. Cytoplazmatické bílkoviny

#### 2.2.1.1. Kreatinkináza (CK)

Je převážně cytoplazmatický enzym, který katalyzuje fosforylaci kreatinu na kreatinfosfát pomocí ATP (<http://www.wikiskripta.eu/>). Kreatinfosfát stejně jako ATP obsahuje fosfátový zbytek vázaný makroergní vazbou. Je potřebný pro svalovou kontrakci, relaxaci a intracelulární transport substancí (Tichý 1993).

Při nedostatku ATP probíhá reakce opačným směrem. CK je přítomna především v kosterním příčně pruhovaném svalstvu, v myokardu a v mozkové tkáni. Jedná se o dimer tvořený podjednotkami, které jsou dvojího typu – M (muscle) a B (brain), každá o relativní molekulové hmotnosti kolem 40 000.

Různým zastoupením podjednotek (monomerů) se odlišují tři izoenzymy kreatinkinázy:

- CK-BB (CK-1, mozkový izoenzym)
- CK-MB (CK-2, myokardiální izoenzym)
- CK-MM (CK-3, svalový izoenzym)

V kosterním svalstvu převažuje izoenzym CK-MM, ale je i přítomen izoenzym CK-MB v množství 1%. V mozku nalzáme prakticky jenom izoenzym CK-BB, který při neporušené hematoencefalické bariéře v krvi neprokazujeme. Pro myokard je

typický izoenzym CK-MB z 20%, ale srdeční svalovina obsahuje i CK-MM z 80% (<http://www.wikiskripta.eu/>).

Katalytická koncentrace celkové CK se zvyšuje v průběhu 3-6 hodin od počátku ischemie myokardu. Vzhledem k nedostatečné kardiospecifitě má její stanovení u akutního infarktu myokardu omezený význam. Hodnota celkové CK je ovlivněna různými faktory (věk, pohlaví, objem svalové hmoty a fyzická aktivita), (<http://www.wikiskripta.eu/>).

Děti mají obvykle vyšší hodnoty než dospělí, pravděpodobně proto, že jsou fyzicky aktivnější. Muži mají vyšší hodnoty než ženy, protože mají větší objem svalové hmoty. Osoby starší 60 let s úbytkem svalstva vykazují klesající aktivitu CK. V posledních letech je používáno stanovení celkového CK i k odhadu velikosti nekrotického ložiska v myokardu a ke sledování úspěšnosti trombolytické léčby.

Izoenzym CK-MM má v lidském séru poločas 16 hodin. Tento izoenzym lze rozdělit na 3-5 subfrakcí. V průběhu poškození tkáně, např. při infarktu myokardu, je ve velkých množstvích vylučována do cirkulace tkáňová forma CK-MM, což je subfrakce CK-MM<sub>3</sub>. Tato subforma je hydrolyzována kardiopeptidázou a dochází postupně ke konverzi na subformy CK-MM<sub>2</sub> a CK-MM<sub>1</sub>. Stanovení CK subforem (izoforem) v séru se nabízí jako alternativní neinvazivní metoda pro diagnostiku a sledování průběhu AIM a úspěchu reperfúze. Využívá se především výpočtu indexu MM<sub>3</sub>/MM<sub>1</sub>, který se zvyšuje již za 2-3 hodiny po IM a vrcholu dosahuje za 9 hodin. Aktivita CK-MM je zvýšená v sérech nemocných progresivní svalovou dystrofií, u dermatomyositidy, u AIM apod. Stanovení je důležitým screeningovým testem pro potvrzení a detekci nosičů v rodinách s Duchenovým typem svalové dystrofie. CK-MM se také zvyšuje po fyzickém cvičení, po intramuskulární injekci nebo po chirurgických zákrocích (Tichý 1993).

Větší diagnostickou hodnotu má vyšetřování izoenzymu CK-MB, má poločas 12 hodin, ale také není plně kardiospecifický. Zvýšení může být způsobeno i poškozením kosterního svalstva (trauma, svalové dystrofie, intramuskulární injekce, resuscitace, defibrilace), extrémním cvičením a chronickou renální insuficiencí (<http://www.wikiskripta.eu/>).

Aktivita CK-MB se zvyšuje do 4 hodin od počátku ischemie, zvýšení přetrvává 24-36 hodin. Při nekróze buněk myokardu je uvolňována izoforma CK-MB2 a ta je v séru konvertována karboxypeptidázou na izoformu CK-MB1. Při akutní nekróze vzniká stav, kdy množství vyplavené CK-MB2 převyšuje CK-MB1 a jejich vzájemný poměr přesáhne 1,5. Je-li současně koncentrace CK-MB2 nad 1,0 U/l, je tento laboratorní nález vysoce specifický a senzitivní pro AIM. Detekce těchto izoform je možná již 3 hodiny od počátku obtíží (Holm a Aschermann 2001).

CK-MB lze stanovovat jako enzymovou aktivitu, která zachytí pouze aktivní molekuly enzymu, nebo imunochemicky jako protein ve formě hmotnostní koncentrace ( $\mu\text{g/l}$ ). V tomto případě hovoříme o CK-MB mass (koncentrace), které je jednoznačně dávana přednost. Stanovení CK-MB mass je specifičtější i citlivější, neboť jím prokazujeme i částečně degradované molekuly, které již enzymovou aktivitu ztratily, reagují však dosud se specifickou protilátkou (<http://www.wikiskripta.eu/>). CK-MB mass je nejvhodnějším markerem reinfarktu a je to akceptovatelný marker AIM pro laboratoře neschopné stanovit troponiny (Pudil a kol. 2007).

Izoenzym CK-BB má velmi krátký poločas, méně než 2 hodiny následkem vysoké klírens a rychlé inhibice. V séru nemocných s postižením centrálního nervového systému je aktivita CK-BB zanedbatelná, s výjimkou akutní fáze poškození. Nemůže být v krvi detekována, dokud je inaktní hematoencefalická bariéra. Nález v séru je pozitivní po kontuzích mozku, u nemocných po iktu, kdy koreluje aktivita CK-BB s rozsahem poškození. CK-BB je také považován za jeden z nádorových markerů, protože bývá prokazován v sérech nemocných některými maligními nádory, např. adenokarcinomem prostaty a prsu (Tichý 1993).

#### **2.2.1.2. Myoglobin (MG)**

Myoglobin je globulární protein tvořený jediným řetězcem aminokyselin, který obsahuje jako prostetickou složku hem. Reverzibilně váže a přenáší kyslík ve svalových buňkách (<http://www.wikiskripta.eu/>). Myoglobin je protein, který se nachází ve všech příčně pruhovaných svalech, včetně myokardu. Při ischemii myokardu je uvolňován

časně. Protože se nachází i v kosterním svalstvu, není myoglobin specificky zvýšen pouze při poškození myokardu, ale může být falešně zvýšen při některých myopatiích a úrazech postihujících svalovou tkáň. Vzhledem k renálnímu vylučování může být myoglobin zvýšen také u stavů renálního selhání. Jako ukazatel nekrózy myokardu má bohužel malou specifitu a příliš rychlou renální clearance (Zima 2002).

Má velmi krátký biologický poločas 10-20 minut, při nekróze kardiomyocytů je proto jen zřídka vylučován do moči. Přítomnost myoglobinu v moči je téměř vždy projevem poškození kosterního svalstva (Friedecký a kol. 2008).

Do krve proniká přímo na rozdíl od kreatinkinázy, která se tam dostává lymfatickou cestou (Racek a kol. 1999).

Jako cytoplazmatický protein s nízkou molekulovou hmotností je rychle uvolňován z postižené tkáně. Vzestup sérových koncentrací myoglobinu u AIM nastupuje rychle, za 0,5-2 hodiny od začátku bolesti na hrudi. Hladiny myoglobinu, které mohou dosahovat 20násobku fyziologických hodnot, kulminují asi za 6-12 hodin a v průběhu 12-24 hodin se vrací k původním hodnotám. Myoglobin je považován za nejcitlivější marker AIM a je vhodný pro časný záchyt AIM (<http://www.wikiskripta.eu/>).

### **2.2.1.3. Laktátdehydrogenáza (LD)**

Je oxidoredukční enzym katalyzující reverzibilní přeměnu laktátu na pyruvát. Struktura molekuly je tvořena 4 podjednotkami o relativní molekulové hmotnosti 34 000. Stejně jako kreatinkináza je i laktátdehydrogenáza (LD) enzym přítomný v cytoplazmě buněk mnoha tkání. Je to stanovení velmi nespecifické pro IM (<http://www.wikiskripta.eu/>).

Stoupá po IM v séru nejpomaleji, vrcholu dosahuje za 2-3 dny, nejdéle zůstává zvýšená až dva týdny. Její stanovení se tedy hodí spíše pro diagnostiku IM v pozdějším období (Racek a kol. 1999). Zvýšení katalytické koncentrace celkové LD v séru doprovází řadu onemocnění, a proto pro diagnózu AIM není příliš významná. Do

cirkulace se uvolňuje již při mírném tkáňovém poškození. Vzhledem k vysokému obsahu v erytrocytech může sérovou koncentraci falešně pozitivně zvýšit hemolýza. Na celkové aktivitě LD se podílí 5 izoenzymů LD1 až LD5. Pro myokard je nejvíce specifická izoforma LD1, méně LD2 (<http://www.wikiskripta.eu/>).

Po infarktu myokardu se poměr LD<sub>1</sub>/LD<sub>2</sub> stává větší než 1, delší pozitivita zůstává kolem 7 dnů (Racek a kol. 1999).

## **2.2.2. Mitochondriální bílkoviny**

### **2.2.2.1. Aspartátaminotransferáza (AST)**

V myokardu je obsažena v relativně vysoké koncentraci (<http://www.wikiskripta.eu/>). Začíná stoupat obvykle za 4-6 hodin po začátku ischemie, vrchol aktivity pozorujeme za 1-2 dny a návrat k normě u nekomplikovaných případů do 5 dnů. Vyplavuje se z cytoplazmy i mitochondrií. Vzhledem k tomuto faktu a k nízké aktivitě alaninaminotransferázy (ALT) v myokardu je pro srdeční infarkt charakteristický poměr AST/ALT větší než 1. Tento poměr najdeme zvýšený i u rozsáhlejšího poškození kosterního svalstva včetně velké svalové námahy. Stanovení aktivity AST není tedy příliš specifické a provádí se spíše z tradice (Racek a kol. 1999). Dnes již není doporučováno.

## **2.2.3. Strukturální bílkoviny**

### **2.2.3.1. Troponiny**

Troponiny tvoří skupina tří globulárních proteinů – troponin C (TnC), troponin I (TnI) a troponin T (TnT), které v reakci s tropomyozinem vytvářejí troponin-tropomyozinový komplex. Tento komplex je součástí kontraktálního aparátu příčně pruhovaného svalstva. Troponiny mají obecně tři izoformy, které se vyskytují jednak v kosterním svalstvu, jednak v myokardu (Holm a Aschermann 2001).

Primární struktura molekul troponinu z kosterního svalu a myokardu je různá a troponiny mohou být imunochemicky odlišeny. Tím byl splněn požadavek na

kardiospecifickou metodu, která by umožnila odlišit postižení myokardu od poškození kosterního svalu. V diagnostice AIM využívá se stanovení kardiálních troponinů T (cTnT) a I (cTnI), (Racek a kol. 1999).

Kardiální izoformy (cTnT a cTnI) mají jedinečné aminokyselinové složení a jsou proto pro myokard specifické. Troponiny jsou definitivním ukazatelem poškození myokardu (<http://www.wikiskripta.eu/>). Výhod stanovení troponinů při diagnostice AIM je několik:

- vysoká specifická pro myokard
- téměř nedetekovatelné hladiny u zdravých jedinců
- mnohonásobné zvýšení koncentrací u AIM
- vysoká citlivost umožňuje odhalit i minimální poškození myokardu
- dlouhodobější přetrvávání zvýšených hodnot může posloužit i pro pozdní diagnostiku IM
- jediný parametr, který je možno stanovit i v hemolytickém vzorku

#### **2.2.3.1.1. Troponin T (TnT)**

Srdeční troponin T (TnT) je vysoce kardiospecifický a velmi citlivý marker pro poškození srdce, který se začíná objevovat v krvi obvykle současně s CK.

Téměř veškerý troponin T (TnT) v myocyty je strukturální komponentou troponinového komplexu, která ho váže k tropomyozinu. Přibližně 6% TnT se nachází volně v cytoplazmě myocytů. Po vzniku ischemie se koncentrace TnT v séru za 4-6 hodin zvyšuje, pravděpodobně se v této fázi vyplavuje TnT z cytoplazmy. Zvýšení koncentrace přetrvává 10 dnů až 2 týdny, v této fázi se uplatňuje pomalejší vyplavování TnT vázaného na troponin-tropomyozinový komplex. Při použití současné techniky využívající pro stanovení cTnT monoklonálních protilátek není často u zdravých osob cTnT v krvi prakticky detekovatelný (Holm a Aschermann 2001).

Průběh uvolňování cTnT je bifázický. Obvykle během 7-10 dnů klesá na nedetekovatelné hladiny. Délka zvýšení závisí na rozsahu infarktu. U rozsáhlejších



infarktů může být cTnT prokazatelný až 21 dnů. Určitou nevýhodou je jeho nespecifické zvýšení u pacientů s renální insuficiencí (<http://www.wikiskripta.eu/>).

Výhodou je až 300násobný vzestup oproti hodnotám před IM (Racek a kol. 1999).

Je nezávislým prognostickým markerem, který může předpovídat krátko-, středně- a dokonce i dlouhodobou prognózu pacientů s akutním koronárním syndromem (AKS). Zvýšené hladiny troponinu T korelují se závažností onemocnění koronární tepny a horším výsledkem. Nízké koncentrace jsou nezávislým znamením kardiovaskulárních potíží včetně výskytu a opakovaného výskytu fibrilace síní (Cobas 2009).

#### **2.2.3.1.2. Troponin I (TnI)**

Troponin I (TnI) je součástí troponinového komplexu inhibujícího interakci myozinových vláken s komplexem aktin-tropomyozin – reguluje tedy kontrakci příčně pruhovaného svalstva. Při nekróze myokardu se koncentrace cTnI zvyšuje asi 6 hodin po vzniku ischemie, zvýšení koncentrace přetrvává 7-10 dnů. Jako laboratorní ukazatel není cTnI vhodný k detekci reinfarktu, ale přetrvávání jeho zvýšené koncentrace umožní diagnostiku IM i při delším časovém odstupu mezi vznikem obtíží a příchodem nemocného k vyšetření (Holm a Aschermann 2001). Ve srovnání s cTnT není u cTnI obvykle pozorováno druhé maximum (menší cytosolová frakce), (<http://www.wikiskripta.eu/>).

#### **2.2.3.1.3. Troponin C (TnC)**

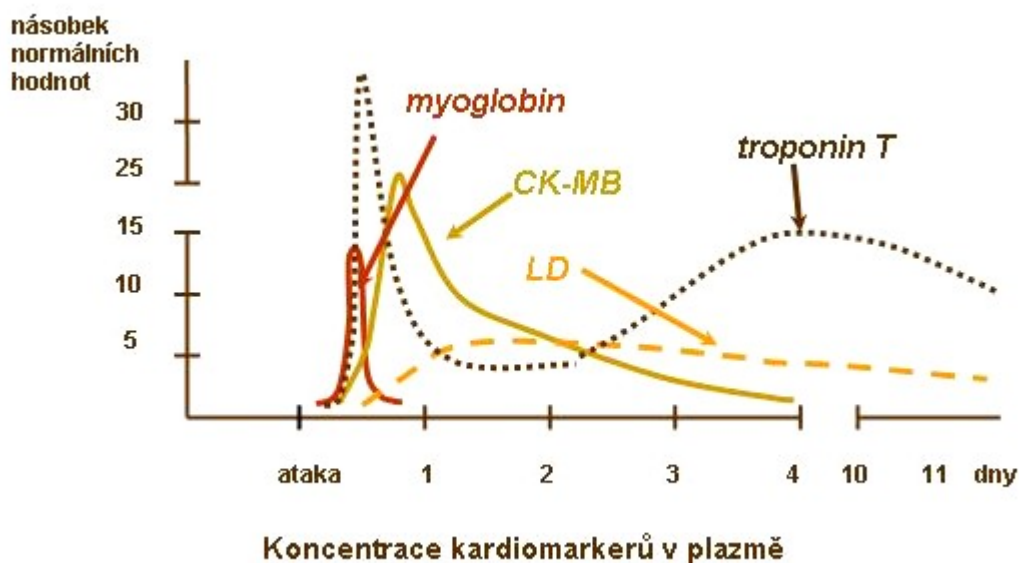
Troponin C (TnC) není pro diagnostiku akutního infarktu myokardu vhodný, protože je identický v srdečním i kosterním svalstvu (<http://www.wikiskripta.eu/>).

**Tab.1** Průběh hladin biochemických ukazatelů u akutního infarktu myokardu

<b>Parametr</b>	<b>Začátek vzestupu hladiny (hodiny)</b>	<b>Vrchol hladiny (hodiny)</b>	<b>Normalizace (dny)</b>	<b>Maximální zvýšení hladin (násobek horní hranice norm. hodnot)</b>	<b>Normální hodnoty</b>
Myoglobin	0,5 – 2	6 – 12	0,5 – 1	20 x	M 19-92 µg/l Ž 12-76 µg/l
CK-MB mass	2 – 6	12 – 24	2 – 3		0,0 – 5,0 µg/l
CK	3 – 6	16 – 36	3 – 5	25 x	M 0,2-3,6 µkat/l Ž 0,2-3,1 µkat/l
cTnT	3 – 8	12 – 18 (1.vrchol) 72 – 96 (2.vrchol)	7 – 14	300 x	0,0-0,05 µg/l
cTnI	3 – 12	12 – 24	5 – 10		0,0-0,1 µg/l
AST	4 – 8	16 – 48	3 – 6	25 x	0,05-0,72 µkat/l
LD	6 – 12	24 – 60	7 – 15	8 x	3,5-7,7 µkat/l

- Horní hranice závisí na věku – uvedené hodnoty jsou pro věk 40 – 50 let

(<http://www.wikiskripta.eu/>)



**Obr. 1** Průběh a mechanismus zvýšení hladin kardiomarkerů při infarktu myokardu (<http://www.wikiskripta.eu/>)

Na grafu jsou znázorněny jednotlivé kardiomarkery. Zobrazují jejich zvýšení v krevní plazmě po prodělaném infarktu myokardu.

**Tab. 2.** Časový průběh plazmatické aktivity jednotlivých biomarkerů nekrózy myokardu

<b>Biomarker</b>	<b>Začátek vzestupu</b>	<b>Vrchol</b>	<b>Přetrvávání</b>	<b>Doporučená frekvence odběru</b>
Myoglobin	1-4 h	6-7 h	24 h	každé 1-2 h
CK-MB	3-12 h	24 h	48-72 h	3krát po 12 h
Troponin I	3-12 h	24 h	5-10 dnů	2krát po > 12 h
Troponin T	3-12 h	12 h – 2 dny	5-14 dnů	2krát po > 12 h

(Špaček a Widimský 2003)

## 2.3. NĚKTERÉ NOVĚJŠÍ MARKERY SRDEČNÍHO SELHÁNÍ

V několika posledních letech se objevují nové perspektivní markery poškození myokardu a zde je jejich stručný přehled.

### 2.3.1. *Ischémii modifikovaný albumin (IMA, albumin-cobalt-binding test, ACB test)*

Vyšetření albuminu modifikovaného ischémii měřené vyšetřením vazby albuminu-kobaltu (ACB test) bylo navrženo jako nový standardní marker tranzitorní ischémie myokardu.

Za fyziologických podmínek se N-terminální část lidského albuminu dokáže silně vázat na stopové prvky, jako je kobalt, měď a nikl. Za tuto vazbu jsou zodpovědné první tři aminokyseliny Asp-Ala-His.

Stanovení vazebné kapacity albuminu pro kobalt je založeno na skutečnosti, že při ischémii dochází u albuminu v cirkulaci ke strukturálním změnám na místě N-terminální části, což má za následek snížení vazebné schopnosti pro tyto kovy. Tento test tedy nepřímo měří schopnost N-terminální části lidského albuminu vázat se na exogenní kobalt.

Vlivem faktorů dochází také k uvolňování mědi z ceruloplasminu a jiných proteinů, které obsahují měď. Měď je navázána albuminem, přičemž dochází ke kompetici mědi i kobaltu na stejných vazebných místech N-terminálního konce albuminu, čímž je blokováno navázání kobaltu na albumin. Také proto se pokles měření kapacity albuminu pro kobalt považuje za nejvhodnější test pro hodnocení ischémie.

Velkou výhodou je časný vzestup od vzniku ischémie. K vzestupu IMA dochází již za několik minut od začátku ischémie a zůstává zvýšený po několik hodin. K návratu k normě dochází za 6 hodin od ischémie.

Vyšší hodnota IMA může být také u nemocných s aktivním karcinomem, bakteriálním nebo virovým infektem, s ischémii mozku a v konečném stádiu renálního selhání a jaterní cirhózy. V některých situacích může být naopak velmi vysoká senzitivita ischémii modifikovaného albuminu nevýhodou – nelze např. podle něj odlišit infarkt myokardu s nekrózou od přechodné ischémie při angině pectoris bez nekrózy myokardu.

Hlavní přínos stanovení je spatřován v diagnostice akutních koronárních syndromů, senzitivita je udávána kolem 82%. IMA je považován vedle anamnézy, EKG a vyšetření troponinů za další ukazatel, který by měl napomoci lékaři v rozhodnutí, kterého pacienta s bolestí na hrudi je možno z ambulance bezpečně propustit domů a kterého je naopak třeba observovat a dále vyšetřovat. Jedná se o první test schopný detekovat myokardiální ischemii nikoliv až nekrózu. Zdá se tedy, že ischemií modifikovaný albumin by mohl do budoucna představovat silný biochemický marker využitelný k průkazu ischemie myokardu (Dušek a kol. 2005).

Možné užití se předpokládá u nemocných s bolestí na hrudi s nespecifickými změnami elektrokardiogramu a negativitou ostatních markerů nekrózy myokardu. To vedlo FDA ke schválení ACB testu pro klinické zkoušení (Pudil a kol. 2007).

### **2.3.2. *Natriuretické peptidy (NP)***

Hlavním stimulem pro tvorbu natriuretických peptidů je zvýšení napětí ve stěně myokardu v důsledku tlakového či objemového přetížení. NP jsou proto velmi vhodným markerem pro srdeční selhání, kde mají poměrně vysokou senzitivitu, avšak nižší specifitu. Ke zvýšení produkce NP může dojít také i u stavů, které jsou provázeny objemovým či tlakovým přetížením z jiných příčin (převodnění organismu, hypertenze a další stavy). Jejich zvýšenou produkcí dále ovlivňují neurohormony (endotelin, argnin-vazopresin a další), (Pudil a Tichý 2010).

Natriuretické peptidy jsou cirkulující hormony, významně zasahující do homeostázy vody a iontů v organismu. Jsou produkovány v řadě orgánů, klinicky nejvýznamnější je jejich syntéza v myokardu. Způsobují vzestup glomerulární filtrace, natriureázy a diurézy, v cévách vasodilataci, mají obecný kardioprotektivní účinek. Blokují neurohormonální systém renin-angiotenzin-aldosteron, kde působí jako antagonisté sympatiku (Pudil a Tichý 2010).

Mezi natriuretické peptidy patří několik strukturně podobných peptidů, které se liší dominantním místem syntézy:

- Arteriální natriuretický peptid (ANP), syntéza v myokardu síní
- Mozkový natriuretický peptid (BNP), syntéza v myokardu komor
- Natriuretický peptid typu C (CNP), syntéza v hypofýze
- D-natriuretický peptid (DNP), izolován z jihoamerické zelené mamby

Ze současných výzkumů zaměřených na rychlost aktivace tvorby ANP a BNP vyplývá, že oba NP jsou součástí integrovaného systému, kdy ANP představuje velmi rychlou odpověď organismu na změny cirkulace a BNP je jakýmsi záložním hormonem, který přebírá hlavní roli v pozdějších fázích přetížení myokardu (Pudil a Tichý 2010).

BNP je v kardiomyocytech syntetizován jako prohormon, který se nazývá proBNP. Po stimulaci kardiomyocytů zvýšeným napětím myokardu je proBNP proteolyticky štěpen na biologicky neaktivní N-terminální část molekuly (NT-proBNP) a biologicky aktivní hormon BNP. Oba peptidy jsou uvolňovány do cirkulace. Biologický poločas BNP je 20 minut, NT-proBNP 60-120 minut (Hradec a kol. 2009).

Stanovení natriuretických peptidů je důležitou součástí diagnostiky srdečního selhání a pro klinickou praxi se především vyjadřují číselné hladiny BNP a NT-proBNP. S hladinou NP významně koreluje stupeň tloušťky stěny levé komory (tzv. masa levé komory), a to nejenom u pacientů se srdečním selháním, ale také v běžné populaci, u pacientů se srdečními vadami a arteriální hypertenzí.

NP mají velký význam pro diagnostiku srdečního selhání, monitorování terapie a odhad prognózy nemocných. První pokusy s terapeutickým využitím NP nebo jejich analog nepřinesly zatím jednoznačné důkazy, které by opravňovaly k jejich použití v klinické praxi (Pudil a Tichý 2010).

### **2.3.3. Vysoce senzitivní troponin T (*hs-TnT, high sensitive*)**

V diagnostice akutních koronárních syndromů má stanovení biochemických markerů nekrózy myokardu, především troponinů, zásadní význam. V současné době je celosvětovým trendem zvyšování citlivosti metod pro stanovení troponinů (I a T) a do popředí se dostávají tzv. ultrasenzitivní metody, které by měly splňovat požadavky kladené definicí AIM. Jako cut-off pro diagnózu IM byla stanovena hodnota 99. percentilu zdravé populace s chybou menší 10%. Zvýšené hodnoty hs-cTn nad cut-off mají vždy svůj původ v poruše struktury kardiomyocytu. Nejvíce očekávaný přínos hs-TnT je v oblasti časně detekce. Kromě klinické problematiky se rozšiřuje problém se standardizací u stanovení troponinů. Vzhledem k vyšší analytické citlivosti jsou ultrasenzitivní metody schopné zachytit i změny malého rozsahu. Do budoucna pravděpodobně všechny laboratoře přejdou na ultrasenzitivní metody. K dosažení plné diagnostické efektivity stanovení troponinů však bude nutná standardizace jeho stanovení (Vašatová a kol. 2010).

### **2.3.4. Mastné kyseliny vázící protein (*FABP*)**

Mastné kyseliny vázící protein (FABPs) jsou relativně malé cytoplazmatické molekuly, které se nalézají především ve tkáních s aktivním metabolismem mastných kyselin. Mezi ně patří jaterní parenchym, střevo a především myokard, kde 50-80% energetické spotřeby zajišťuje metabolismus mastných kyselin lipidovou oxidací. Doposud bylo identifikováno 9 typů FABP (Pudil a kol. 2008).

Srdeční izoforma FABP (H-FABP) není orgánově specifická (Friedecký a kol. 2008). Ačkoliv je dominantním místem tvorby FABP myokard, v podstatě menší míře jej lze také detekovat v příčně pruhovaném svalstvu, distálních tubulech ledvin a některých částech mozku. Za fyziologických podmínek jsou koncentrace FABP v plazmě a v intersticiální tekutině velmi nízké až nedetekovatelné. Za fyziologických podmínek ovlivňuje plazmatickou hladinu FABP pohlaví (muži mají větší objem příčně pruhovaného svalstva), dále věk a funkce ledvin.

V průběhu ischemického poškození myokardu FABP se velmi rychle dostává do intersticiálního prostoru a záhy do periférní krve, kde jej lze detekovat již za 90 minut,

za 6 hodin dosahuje hladina svého vrcholu. Lze jej detekovat nejenom v periferní krvi, ale také v moči. Je to především časný marker AIM a prokázal významně lepší senzitivitu než myoglobin.

Ukazuje se potencionálně velmi významné místo stanovení FABP u pacientů přicházejících k vyšetření bolesti na hrudi velmi časně, kdy ještě nelze očekávat případnou pozitivitu srdečních troponinů, tedy do 6 hodin po vzniku příhody (Pudil 2008).

### **2.3.5. C-reaktivní protein (CRP)**

U nemocných s AKS jsou zjišťovány zvýšené koncentrace biomarkerů zánětu. CRP je klasická bílkovina akutní fáze. Molekula se skládá z pěti identických polypeptidových řetězců, patří mezi tzv. pentraxiny. Poločas v plazmě má 19 hodin a jeho koncentrace stoupá při akutním stavu, např. AIM za 6-10 hodin, maxima dosahuje za 24-48 hodin a k normálním hodnotám se vrací během asi 4 dní. Tradičně je CRP využíván v diagnostice a monitorování infekčních a autoimunních onemocnění. CRP je dominujícím proteinem akutní fáze a jeho koncentrace se může za patologických stavů zvýšit až 1000x. U zdravých jedinců je sérová koncentrace CRP většinou pod 1 mg/l. Pomocí velmi citlivých metod lze toto tzv. „vysoce senzitivní CRP“ (hsCRP) stanovit od hodnoty kolem 0,1 mg/l. Protože se zánět jeví jako důležitá součást aterosklerózy, ukazuje se tzv. ultrasenzitivní nebo hsCRP jako faktor vysokého rizika kardiovaskulární příhody u nemocných s rizikem i bez rizika evidentního koronárního onemocnění. Pro vyhodnocení rizika u AKS byly použity u CRP různé rozhodovací limity od 3 do 15 mg/l. Musíme mít na paměti, že stanovení CRP je naprosto nespecifické a je nutné provádět je v období mimo zvýšený výskyt infekcí (Tichý).

Význam změn CRP pro predikci vzniku AKS, pro stanovení diagnózy IM a volbu léčby není dosud průkazný. Interpretaci koncentrací CRP v krvi znesnadňuje jeho vysoká biologická a analytická variabilita (Friedecký a kol. 2008).



### **2.3.6. Solubilní CD40 ligand (sCD40L)**

CD40 je transmembránový protein, který se vyskytuje v aktivovaných trombocytech, buňkách hladkého svalstva, makrofázích apod. (Pudil a kol. 2007). Při aktivaci trombocytů v destabilizovaných aterosklerotických placích je uvolňován do krve jako solubilní CD40L (sCD40L). Je markerem aktuální trombogenní aktivity (Friedecký a kol. 2008).

Zvýšení koncentrace sCD40L bylo zjištěno u zánětlivých onemocnění (autoimunní choroby, sclerosis multiplex) jako i u hypercholesterolémií a diabetu. Zvýšené hodnoty sCD40L byly zjištěny u akutních koronárních syndromů. Solubilní ligand (sCD40L) je uvolňován do cirkulace a je detekovatelný v séru i v plazmě.

Stanovení koncentrace sCD40L může pomoci odhalit pacienty se zvýšeným rizikem trombózy a může být užitečným použitelným indikátorem nestability aterosklerotického plátu u AKS ve spojení s markery srdeční ischemie (Pudil a kol. 2007).

### **2.3.7. Placentární růstový faktor (PIGF)**

Jednou z tzv. nových molekul studovaných v souvislosti s procesy ischemie/nekrózy myokardu je placentární růstový faktor (PIGF). PIGF patří do rodiny proteinů odvozených od destiček s funkcí chemoatraktantu pro monocyty. PIGF má hmotnost 50kDa, je složený ze 149 aminokyselin. Vyskytuje se ve dvou izoformách PIGF-1 a PIGF-2. Jeho produkce byla prokázána také v řadě tkání (štítná žláza, plíce, placenta), avšak jeho funkce nebyly plně objasněny. Předpokládá se, že by mohl sloužit jako biomarker stability/ruptury aterosklerotického plátu, méně pak ischemie, trombózy a změn hemostázy v průběhu akutních koronárních syndromů. PIGF má totiž významnou roli v regulaci růstu a funkce cévního endotelu. Podle zatím nečetných sdělení se plazmatický PIGF ukazuje jako nezávislý ukazatel nepříznivého vývoje u nemocných a AKS (Pudil a kol. 2008).

Stanovení sety založenými na metodě ELISA trvá asi 4,5 hodiny (Pudil a kol. 2007).

Je velmi perspektivní nejenom jako marker rizikovosti, ale současně i jako místo terapeutického zásahu (Tichý).

### **2.3.8. Glykogenfosforyláza BB (GPBB)**

Glykogenfosforyláza ( $\alpha$ -1,4-d-glukagon ortofosfát D-glukosyltransferáza) je dimerický enzym složený ze dvou identických podjednotek. V lidských tkáních jsou přítomny tři izoenzymy glykogenfosforylázy (GP): GPLL (jaterní), GPMM (tkáň příčně pruhovaného svalstva, méně myokard) a GPBB (mozek, myokard). GPBB není výlučně obsažena v mozku a v myokardu, ale v malém množství také v leukocytech, slezině, ledvinách, močovém měchýři, v zažívacím traktu a aortě. Glykogenfosforyláza je glykolytický enzym, který má důležitou úlohu v metabolismu sacharidů. Katalyzuje první krok glykogenolýzy, tj. enzymatickou konverzi glykogenu na glukózo-1-fosfát. GPBB je spolu s glykogenem v makromolekulárním komplexu navázána na sarkoplazmatické retikulum. V případě tkáňové ischémie dochází k uvolnění glykogenu a GPBB je konvertována z vázané formy na volnou, která se uvolňuje do cytoplazmy a volně difunduje do extracelulárního prostoru. Tato difúze je usnadněna poruchami permeability buněčné membrány, ke kterým dochází v průběhu ischémie a nekrózy myokardu. GPBB je velmi citlivý marker myokardiální nekrózy a ischémie s časným vzestupem hodnot po AIM za 2-4 hodiny po začátku bolesti, vrcholu dosahuje za 6-20 hodin a k normě se navrácí za 1-2 dny (Pudil a kol. 2008).

Předběžná klinická pozorování jsou nadějná, ale doposud chybí kvalitní komerční soupravy (Pudil a kol. 2007).

## **2.4. DOBA ODEZVY PRO STANOVENÍ SRDEČNÍCH BIOMARKERŮ (TURN AROUND TIME, TAT)**

- a) Maximální doporučená doba odezvy (tj. časový interval od ordinace vyšetření do doby sdělení výsledku) má být do 60 minut.
- b) U nemocných ošetřovaných na koronárních jednotkách intenzivní péče má být maximální doba odezvy do 30 minut.
- c) Uvedené požadavky na TAT vyžadují přípravu a uplatňování systému rychlého transportu, neprodleného převzetí a přednostního vyšetření materiálu v laboratoři a jejich trvalou kontrolu (Friedecký a kol. 2008).

### **3. Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce je pokud možno podat celkový přehled o markrech infarktu myokardu stanovovaných v klinické biochemii.

Teoretická část bude zaměřena především na podání základního přehledu markerů infarktu myokardu, jejich postupnému objevování a zavedení do klinické praxe z pohledu historie, souhrn dnes již běžně užívaných markerů v laboratorní praxi a dále novějších markerů infarktu myokardu. Přináším poznatky o nových molekulách, které by mohly mít význam nejenom pro výzkum, ale také pro klinickou praxi.

Praktickou částí se pokusím podat přehled o metodách klinicky používaných pro průkaz markerů infarktu myokardu v krvi pacienta. Externí metoda pro stanovení markerů infarktu myokardu pomocí Point of care testing (POCT). V klinické biochemii používané imunochemické metody ( na principu chemiluminiscence). Součástí této části je seznámení s metodou budoucnosti, která je zatím v období klinického vývoje (stanovení kardiálních markerů technologií proteinových biočipů-multimarkerová strategie).

## **4. Praktická část**

### **4.1. POINT OF CARE TESTING (POCT)**

V posledních letech narůstá počet vyšetření na přístrojích pro Point-Of-Care testing (POCT) mimo prostory klinické laboratoře. Vyšetření na POCT přístrojích jsou obvykle prováděna pracovníky, kteří nejsou edukováni v laboratorní medicíně a seznámení s pravidly správné laboratorní praxe ( Kessler 2010).

V současnosti jsou komerčně dostupné systémy POCT k průkazu nekrózy myokardu (cTnT, cTnI, CK-MB mass, myoglobin), k identifikaci akutního srdečního selhání (BNP, NT-proBNP) a hodnocení zánětu (CRP). Jako biologických vzorků se používá pro měření krev nebo plazma. Postupy POCT jsou určeny především pro pracoviště intenzivní kardiologické péče k usnadnění diagnózy AIM, měly by být používány v situacích, kdy nelze docílit stanovení srdečních markerů s TAT do 60 minut. Analytické parametry měření POCT by se neměly lišit od parametrů dosažených pro stejné markery na laboratorním pracovišti (Friedecký a kol. 2008).

V současnosti je několik komerčně dostupných POCT analyzátorů pro diagnostiku srdečních markerů. Jedním z nejnovějších je analyzátor firmy Radiometer AQT 90 Flex. Jedná se o stolní analyzátor, se zabudovaným vertikálně rotačním držákem na dvě zkumavky. Minimální objem vzorku ve zkumavce je 2 ml bez ohledu na počet požadovaných vyšetření. Principem stanovení na analyzátoru AQT 90 Flex je jednokroková heterogenní sendvičová imunoanalýza. Doba stanovení jednoho testu je řádově 20 minut (Vaingátová a Dubská 2010).

## 4.2. IMUNOCHEMICKÉ METODY

Imunochemické metody jsou založeny na principu reakce antigenu s protilátkou, tedy reakcí mezi antigenní determinantou a vazebným místem na protilátce.

**Antigeny** jsou makromolekuly přirozeného nebo umělého původu. Po chemické stránce jsou to polymery – proteiny, polypeptidy, polysacharidy nebo nukleoproteiny. Antigeny mají dvě základní vlastnosti. Vyvolávají specifickou imunitní odpověď a specificky reagují s produkty této odpovědi (protilátky a imunokomplementární buňky).

**Protilátky** jsou produkovány plazmatickými buňkami vyvíjejícími se z B-lymfocytů po stimulaci antigenem. Protilátky jsou heterogenní skupina glykoproteinů označovaná jako imunoglobuliny. Imunochemické metody využívají protilátky vyrobené různým způsobem. Monoklonální protilátky jsou produkty jednoho klonu plazmatických buněk odvozených od B-lymfocytů, připravených v laboratorních podmínkách hybridimovou technologií (Střížová 2010).

Základní princip, který využívají různé imunochemické metody, vychází z kvantitativní imunoprecipitační reakce. Na měření tvorby komplexu antigenu a protilátky je založené stanovení celé řady analýz v tělesných tekutinách. Reakce rozpustného antigenu s několika antigenními determinantami a odpovídající protilátkou je možno prokázat vznikem precipitátu v roztoku. Bude-li se do zkumavek obsahujících konstantní množství protilátky přidávat ve stoupajícím množství antigen, v některých z nich se vytvoří precipitát. Množství precipitátu se vztahuje ke koncentraci přítomného antigenu (Střížová 2010).

### 4.2.1. Imunochemické stanovení na principu chemiluminiscence

#### **Princip:**

System měří kvantitativní množství světla emitovaného během chemiluminiscenční reakce. Pevná fáze jsou paramagnetické částice, značkovač je acridinium ester jako chemiluminiscenční látka, která emituje světlo při oxidaci

peroxidu vodíku v alkalickém prostředí. Reakce probíhá během jedné sekundy a je velice citlivá ( $10^{-15}$ ). Analyzovaným materiálem je sérum/plazma nebo moč.

#### **Přístrojové vybavení:**

Na principu chemiluminiscence pracuje plně automatizovaný imunochemický analyzátor ADVIA Centaur XP.

Jedná se o analyzátor pro rutinní i statimová vyšetření. Pracuje s diagnostickými soupravami firmy SIEMENS. Pracuje po pacientech při využití principu „RANDOM ACCESS“, to znamená provádějí se analýzy v optimálním časovém rytmu. Výkon má 240 stanovení za hodinu, první výsledek je po 15 minutách, dále každých 15 sekund. Dávkování vzorku 10-200  $\mu$ l do akrylových kyvet na jedno použití. Pro stanovení kardiomarkerů jako jsou BNP, CK-MB, cTnI ultra, myoglobin. Analyzátor sestává z vlastního přístroje a řídicího počítače s aplikačním softwarem.

#### **Reagencie:**

- Base reagent
- Acid reagent
- Liguicheck-Cardiac markers Plus Control (6x3ml), od firmy BioRad
- Kazetové sety: TnI-ultra, CK-MB, myoglobin (od firmy SIEMENS)

#### **Pracovní postup:**

1. Před analýzou zkontrolovat, zda je dostatek provozních roztoků a prázdná odpadní nádoba.
2. Vložit do analyzátoru kazetový karusel s reagensy.
3. Zapnout přístroj a počítač.
4. Vložit a zadat měření kontrolních roztoků.
5. Vyhodnotit výsledky kontrol.
6. Vložit do analyzátoru karusel se vzorky a zadat požadavky.
7. Vyhodnotit měřené vzorky.
8. Vypnout přístroj, vyprázdnit odpadní nádoby, vyjmout karusel s reagensy a uchovat v lednici do dalšího stanovení.

Písemné materiály poskytl biochemická laboratoř, Oblastní nemocnice Náchod a.s.

### **4.3. STANOVENÍ KARDIÁLNÍCH MARKERŮ TECHNOLOGIÍ PROTEINOVÝCH BIOČIPŮ – MULTIMARKEROVÁ STRATEGIE**

Současně s rozvojem nových biomarkerů dochází zároveň k rozvoji nových komerčně dodávaných diagnostických soustav založených na různých technologiích. Současná biochemie nabízí možnosti stanovení více parametrů postižení myokardu současně tzv. multimarkerová strategie.

Na základě doporučení se zaměřením na multianalytovou strategii se testovala technologie proteinových biočipů umožňující simultánní stanovení několika analytů z jednoho vzorku. Evidence Investigator (tm), biočipový analyzátor firmy Randox (Randox Laboratories Ltd., Velká Británie) umožňuje současné testování několika analytů z jednoho vzorku. Systém má proti klasickým imunochemickým technikám výhody zahrnující multiplexní přístup k analýze a možnost redukce objemů vzorku a reagensů.

Měření kardiálních markerů je založeno na principu sendvičové enzymoimunoanalýzy. Na přesně definovaných pozicích jsou na biočipu navázané protilátky proti jednotlivým analytům. Pro detekci protilátek je využívána chemiluminiscenční reakce peroxidu s luminolem, katalyzována křenovou peroxidázou. Luminiscence je cíleně snímána z jednotlivých ploch na biočipu CCD kamerou. Zobrazovací technologie umožňuje kvantifikovat množství světla vycházejícího z jednotlivých reakčních ploch a software systému signály přepočítá na hodnotu koncentrací analytů ve vzorku.

Diagnostický panel Cardiac Array obsahuje dobře známé kardiální markery rutinně používané v klinické praxi: izoenzym kreatinkinázy CK-MB (CK-MB mass), myoglobin (MG) a srdeční troponin I (cTnI) společně s novými analyty jako jsou BB izoenzym glykogenfosforylázy (GPBB), srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP) či karboanhydráza III (CAIII), které nejsou zatím součástí rutinní klinické praxe. Jako biologický materiál první volby je výrobcem upřednostňováno sérum. Všechny koncentrace kardiálních markerů jsou udávány v  $\mu\text{g/l}$ . Devítibodová kalibrační závislost sestavená výrobcem je součástí každého setu.

Multiplexová analýza systémem Evidence Investigator je vhodná zatím zejména pro výzkumné účely. Nevýhodami tohoto poloautomatického systému zůstávají velký podíl manuální práce a nutnost sběru série vzorků. Stanovení více kardiálních markerů



pomocí proteinových biočipů umožní komplexnější pohled na diagnostiku poškození myokardu a využití multiplexního přístupu zvyšuje diagnostickou senzitivitu a specificitu biočipového stanovení ve srovnání s jednotlivými testy (Ulrychová a kol. 2009).

## 5. Závěr

Z uvedeného orientačního přehledu ukazují na některé nové poznatky o starých markerech infarktu myokardu používaných již běžně v klinické praxi, lze říci, že současná klinická biochemie nabízí kardiologovi široké spektrum možností. Za klasické markery, které se stanovují při infarktu myokardu je vyšetření myoglobinu, troponinů a CK-MB mass (hmotnostní koncentrace). Avšak žádný z těchto markerů není dosud ideální.

Spolu s vývojem roste i množství nových biomarkerů infarktu myokardu, mezi nimiž se hledá marker, který bude splňovat všechny požadavky a bude vykazovat vysokou specificitu.

V nejbližší budoucnosti bude mít velké uplatnění stanovení troponinů ultrasenzitivní metodou, která dokáže zachytit i změny malého rozsahu. Postupně zcela nahradí dosavadní stanovení troponinů. Není pochyb o jejich významném přínosu.

Molekula, která by mohla do budoucna představovat slibný biochemický marker využitelný k průkazu ischemie myokardu v klinické praxi je ischemií modifikovaný albumin, mastné kyseliny vázící protein či glykogenfosforyláza BB. Ostatní markery neposkytly zatím jednoznačné důkazy, které by opravňovaly k jejich použití v klinické praxi. S rostoucím počtem nových markerů, nastává i období, kdy některé staré markery jsou opouštěny např. AST, LDH.

## 6. Seznam zkratek

ACB test – albumin-cobalt- binding test (vazebná kapacita albuminu na kobalt)

ACC – American College of Cardiology

AIM – akutní infarkt myokardu

AKS – akutní koronární syndrom

ALT – alaninaminotransferáza

ANP – artriální natriuretický peptid

AST – aspartátaminotransferáza

ATP – adenosintrifosfát

BNP – mozkový natriuretický peptid

CAIII – karboanhydráza III

CCD – Charge-Coupled Device

CK – kreatinkináza

CK-BB – BB izoenzym kreatinkinázy

CK-MB – MB izoenzym kreatinkinázy

CK-MB mass – MB izoenzym kreatinkinázy (hmotnostní koncentrace)

CK-MM – MM izoenzym kreatinkinázy

CNP – natriuretický peptid typu C

CRP – C-reaktivní protein

cTn – srdeční troponiny

cTnC – kardiální troponin C

cTnI – kardiální troponin I

cTnT – kardiální troponin T

DNP – D-natriuretický peptid

EKG – elektrokardiografie

ELISA – enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

ESC – European Society of Cardiology

FABP – mastné kyseliny vázající protein

FDA – Food and Drug Administration

GPBB – BB izoenzym glykogen fosforylázy

GPLL – LL izoenzym glykogen fosforylázy

GPMM – MM izoenzym glykogen fosforylázy

H-FABP – srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny  
hsCRP – vysoce senzitivní CRP  
hs-cTnT – vysoce senzitivní kardiální troponin T  
hs-Tn – vysoce senzitivní troponin  
IFCC – Mezinárodní federace klinické biochemie a laboratorní medicíny  
IM – infarkt myokardu  
IMA – ischemií modifikovaný albumin  
iso-LD – izoforma LD  
LD – laktátdehydrogenáza  
LDH – dehydrogenáza kyseliny mléčné  
MG – myoglobin  
NACB – Národní akademie klinické biochemie USA  
NP – natriuretické peptidy  
NT-proBNP – neaktivní N-terminální část molekuly proBNP  
PIGF – placentární růstový faktor  
POCT – point of care testing  
pro-BNP – prohormon BNP  
sCD40L – solubilní CD40 ligand  
TAT – Turn And Time

## 7. Literatura

Dušek J., Tichý M., Štásek J., Bis J., Gregor J. a kol. (2005) Ischemií modifikovaný albumin: nový marker ischemie myokardu. Časopis lékařů českých 5/2005, ročník 144, str. 295-297

Friedecký B., Engliš M., Franeková J., Jabor A., Kratochvílová J. a kol. (2008) Doporučení České společnosti klinické biochemie ke stanovení biochemických markerů poškození myokardu. Klinická biochemie a metabolismus 1/2008, 16(37), str. 50-55  
Dostupné z: [http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2008/1-08/kardialni\\_dopor.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2008/1-08/kardialni_dopor.pdf)

Friedecký B., Tichý M., Kratochvíla J., Vašatová M., Pudil R. a kol. (2010) Srdeční troponiny – historie, současná praxe, novinky a trendy. Klinická biochemie a metabolismus 4/2010, 18(39), str. 184-189

Holm F., Aschermann M. (2001) Úloha troponinů a jiných laboratorních ukazatelů nekrózy myokardu ve stratifikaci rizika nemocných s akutními koronárními syndromy bez elevace segmentu ST. Cor et Vasa 2001, 43(8), str. 406-409

Hradec J., Krupička J. a Janota T. (2009) Budeme léčit srdeční selhání podle plazmatické koncentrace natriuretických peptidů? Časopis lékařů českých 8/2009, ročník 148, str. 383-388

Kessler P. (2010) Externí hodnocení kvality vyšetření INR na POCT přístroji. Klinická biochemie a metabolismus 4/2010, 18(39), str. 210-213

Pudil R., Tichý M. a Vojáček J. (2007) Kardiomarkery na prahu třetího tisíciletí. Intervenční a akutní kardiologie 1/2007, ročník 6, str. 20-23

Pudil R., Horáková J., Ulrychová M., Vojáček J. a Tichý M. (2008) Biomarkery ischemie a nekrózy myokardu v roce 2008. Vnitřní lékařství 2008, 54(10), str. 965-970

Pudil R., Tichý M. (2010) Natriuretické peptidy a srdeční selhání – současný pohled. *Klinická biochemie a metabolismus* 4/2010, 18(39), str. 190-195

Racek J. a kol. (1999) *Klinická biochemie, Laboratorní diagnostika infarktu myokardu*. 1. vydání, Galén, Praha, str. 173-177

Střížová Iveta (2010) Intrathékalní syntéza IgG: porovnání stanovení výpočtem dle Reibera s detekcí oligoklonálních páسů a cytologickým nálezem. *Bakalářská práce*. Katedra biochemických věd. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 19-20

Tichý M. (1993) Kreatinkináza – enzym mnoha forem. *Vojenské zdravotnické listy* 6/1993, ročník LXII, str. 193-196

Tichý M., Friedecký B., Palička V., Horáček J., Jebavý L. a Pudil R. (2004) Biomarkery akutních koronárních syndromů a srdeční nedostatečnosti. *Vojenské zdravotnické listy* 4/2004, ročník LXXIII, str. 124-129

Tichý M., Pudil R. a Friedecký B. (2010) Biomarkery onemocnění srdce. *Klinická biochemie a metabolismus* 4/2010, 18(39), str. 183

Troponin T hs, materiál od firmy Roche Diagnostics GmbH, 2009-02, str. 1-5 (COBAS)

Ulrychová M., Tichý M., Pudil R., Horáková L. a Horáček J. (2009) Stanovení kardiálních markerů technologií proteinových biočipů-multimarkerová strategie. *FONS bulletin* 2/2009, ročník 19, str. 8-11.

Dostupné z: <http://www.stapro.cz/bullfons/22009/lab01.pdf>

Vaingátová S., Dubská L. (2010) AQT Flex-POCT analyzátor pro stanovení markerů poškození myokardu. *FONS bulletin* 2/2010, ročník 20, str. 15-19

Dostupné z: <http://www.stapro.cz/bullfons/22010/lab01.pdf>

Vašatová M., Holečková M., Bartošková I., Tichý M. a Friedecký B. (2010) Kardiální troponin T ultrasenzitivní metodou. *Klinická biochemie a metabolismus* 4/2010, 18(39), str. 196-199

Wikiskripta, Kardiomarkery [cit. 2011-02-05]. Dostupné z: <http://el.lf1.cuni.cz/kardio/>

Zima T. (2002) *Laboratorní diagnostika, Laboratorní diagnostika v kardiologii*. 1. vydání, Galén, Praha, str. 9-14